

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01296

· 论 著 ·

耐紫杉醇肺癌细胞 BNX 动物模型的建立

沙慧芳*, 孙强玲, 杨晓华

上海市胸科医院胸部肿瘤研究所基础研究室, 上海 200030

[摘要] **目的** 建立一种耐药性稳定的人肺癌 BNX 小鼠皮下移植瘤模型, 为研究体内肿瘤耐药机制和逆转药物的筛选奠定实验基础。 **方法** 将体外培养的对数生长期的肺癌耐药细胞株 A549-Taxol, 接种在免疫缺陷小鼠的皮下, 形成肿瘤, 采用肿瘤组织块或肿瘤组织原代培养的细胞, 分别于动物皮下接种致瘤; 体内外交叉进行致瘤, 提高耐药细胞株 A549-Taxol 的致瘤率和缩短致瘤时间。通过免疫组化鉴定该耐药细胞的特性。用 MTT 法检测细胞的耐药指数。 **结果** 耐药细胞接种于 SCID 小鼠 4 个月内在皮下形成肿瘤灶。用该肿瘤组织块或细胞悬液移植于 SCID 小鼠, 通过反复 3 次后, 细胞生长速度变快, 2 个月后皮下即可形成肿瘤。将该细胞移植于 BNX 小鼠, 以同样的方法将瘤组织体内外交叉进行致瘤, 最终 BNX 小鼠种植成功率达到 80%。致瘤时间为 3 周。耐药细胞和组织块 P-gp170、GST- π 和 MMP-7 均高表达。A549-Taxol 细胞的紫杉醇半数抑制浓度(IC₅₀)是亲代 A549 细胞的 520 倍。 **结论** 初步建立了人肺腺癌耐药细胞(A549-Taxol)的动物模型, 为肺癌临床个体化治疗及耐药逆转研究等提供了良好的实验动物平台。

[关键词] 肿瘤抗药性; 紫杉醇; 动物模型**[中图分类号]** R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)12-1296-04

Establishing a paclitaxel-resistant BNX mouse model of human lung cancer

SHA Hui-fang*, SUN Qiang-ling, YANG Xiao-hua

Basic Research Laboratory, Institute of Cancer Research, Chest Hospital, Shanghai 200030, China

[Abstract] **Objective** To establish a paclitaxel-resistant BNX mouse model of human lung carcinoma, so as to provide evidences for studying chemoresistant mechanism and for screening of the reversal drugs *in vivo*. **Methods** The resistant model was produced by repeating a crossover subcutaneous injection of human lung cancer A549-Taxol cells and transplantation of tumor fragment into immune deficiency mice, so as to increase the tumor forming rate of A549-Taxol cells and shorten the tumor forming time. The expressions of GST- π , P-gp170 and MMP-7 were examined by immunohistochemical staining. The chemosensitivities of tumor cells to Taxol were tested and IC₅₀ was measured by MTT. **Results** Tumor niduses were observed subcutaneously in SCID mice 4 months after injection of A549-Taxol cells, and then the tumor fragment or the tumor cells suspension were injected to SCID mice again. After 3 times of crossover injection, the tumor cells grew faster and tumor niduses were formed 2 months after injection. The same procedure was done in BNX mice. Finally, we achieved a successful rate of 80% in tumor implantation in BNX mice; the tumor niduses could be formed in 3 weeks. P-gp170, GST- π and MMP-7 expression was higher in the experiment group than that in the A549 control group. IC₅₀ value of paclitaxel for A549-Taxol cells was 520 folds that of A549 cells. **Conclusion** We have successfully established paclitaxel-resistant lung carcinoma model in mice, which provides a new platform for further study on chemoresistant reversal strategy and individualized clinical treatment.

[Key words] neoplasm drug resistance; paclitaxel; animal models

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(12):1296-1299]

化疗是治疗肿瘤的主要手段之一, 而化疗耐药又是导致肿瘤治疗失败的重要原因之一, 尤其多药耐药(multidrug resistance, MDR)是肿瘤化疗中最大的难点^[1]。到目前为止, 临床上还没有好的方法

来解决这一难题。

以往对肺癌细胞化疗耐药研究多采用体外细胞系的研究方法。在化疗过程中肿瘤 MDR 的产生与机体免疫系统及化疗药物有密切关系, 应用肿瘤细

[收稿日期] 2011-07-08 **[接受日期]** 2011-09-27**[基金项目]** 国家自然科学基金(81001037), 上海市自然科学基金(10ZR1428100), Supported by National Natural Science Foundation of China(81001037) and Natural Science Foundation of Shanghai(10ZR1428100).**[作者简介]** 沙慧芳, 主任技师。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-62821990-90430, E-mail: shahuifang5316@126.com

胞系进行体外肿瘤 MDR 的研究,难以模拟化疗药物及内环境对肿瘤细胞 MDR 形成的影响。近年来虽然肺癌的耐药细胞株已建立了不少,但国内到目前为止仅有一篇有关肺癌耐药 A549/DDP 的动物模型报道^[2]。本研究室前期建立了一株耐紫杉醇(Taxol)的人肺腺癌细胞株^[3],为研究体内筛选有效逆转肿瘤 MDR 的药物以及深入探索肿瘤耐药机制,我们利用该细胞株建立了肺癌耐药动物模型,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 细胞和动物 人肺腺癌细胞(A549)购自中科院生化细胞所细胞库,耐紫杉醇人肺腺癌细胞株(A549-Taxol)由本研究室建立^[3]。SCID 小鼠和 BNX 小鼠(三联免疫缺陷小鼠),均为雌性,8 周龄,体重 20 g 左右,购于上海市肿瘤研究所。

1.2 主要试剂和仪器 高糖 DMEM 培养基、胎牛血清购于 Gibco 公司,胰蛋白酶购于钰森生物医疗技术有限公司,培养瓶、培养板购于 Corning 公司。四甲基偶氮唑盐(MTT)和二甲基亚砷购于美国 Sigma 公司,紫杉醇由美国百时美施贵宝公司提供。谷胱甘肽 S-转移酶(GST- π)抗体、糖蛋白(P-gp170)抗体和基质金属蛋白酶(MMP-7)抗体购于长岛生物技术有限公司。主要仪器有超净工作台、全自动酶标仪、CO₂培养箱、倒置相差显微镜、Leica Qwin 图像分析仪、离心机等。

1.3 细胞培养 人肺腺癌 A549 细胞和 A549-Taxol 细胞培养于含 10% 灭活胎牛血清的高糖 DMEM 培养液,置于 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中培养。细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.4 动物接种 SCID 小鼠每组 3 只,BNX 小鼠每组 10 只。取对数生长期的细胞,经胰蛋白酶消化收集细胞,PBS 洗 1 次,悬浮于生理盐水,细胞以 5×10^7 接种于 SCID 小鼠皮下,待形成肿瘤后,在无菌条件下取出瘤组织,将组织块置于培养皿内,剪碎成米粒样大小,取一部分作原代培养,另一部分组织块移植于 SCID 小鼠皮下致瘤。原代培养的耐药细胞经过传代培养后再接种 SCID 小鼠致瘤,反复 3 次后,细胞生长速度变快,皮下致瘤时间变短。将该细胞接种于 BNX 小鼠,以同样的方法经过皮下致瘤,取出瘤组织,部分组织做体外培养,部分组织做皮下移植,反复 3 次以提高细胞致瘤的速度和成功率。

1.5 细胞免疫化学 A549 亲代细胞和采用移植瘤组织原代培养的 A549-Taxol 细胞(密度为 2×10^4 / ml)分别滴加在培养皿中的盖玻片上进行爬片,待盖玻片上细胞生长至 70% 密度时用 TBS 洗涤,丙酮固定。采用 EnVision 二步法,在盖玻片上滴加一抗

(GST- π 、P-gp170 和 MMP-7 抗体浓度 1 : 100),4℃ 过夜。PBS 洗涤后滴加二抗,室温下温育 30 min, PBS 洗涤,DAB 显色 5~10 min,苏木精衬染。用 PBS 代替一抗做阴性对照。

1.6 免疫组化检测^[4] 取出小鼠皮下致瘤的组织经石蜡包埋,5 μ m 切片,脱蜡至水化,置于柠檬酸缓冲液(pH=6.0)中煮沸加热 20 min 修复抗原,自然冷却后蒸馏水漂洗,置于 TBS 中 10 min,滴加 3% 过氧化氢孵育 10 min 阻断内源性过氧化物酶,蒸馏水漂洗,置于 TBS 中 10 min,滴加耐药相关抗体(GST- π 、P-gp170 和 MMP-7 抗体以 1 : 50 稀释),4℃ 孵育过夜,TBS 漂洗 5 min \times 3 次,滴加二抗,1 : 50 稀释,室温孵育 30 min,TBS 漂洗 5 min \times 3 次,DAB 显色 3~5 min,光镜控制,蒸馏水漂洗,苏木精复染,中性树胶封固。EnVision 系统检测表达情况,胞质中有棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞。阴性对照采用缓冲液代替一抗。

1.7 MTT 法测定 A549-Taxol 细胞耐药性 将细胞以 3×10^4 / ml 接种于 96 孔培养板,每孔 100 μ l。紫杉醇用培养液稀释成终浓度为 20、40、80、160、320、640 递增至 20 000 μ g/L,每孔内加入相应浓度药物 100 μ l,每一浓度重复 3 孔。并设对照组加 100 μ l 培养液。培养 48 h 后每孔加入 20 μ l 5 g/L 的 MTT 溶液,继续培养 4 h 后,弃上清,每孔加入 200 μ l 二甲亚砷,振荡器上充分混匀,酶标仪以波长 540 nm 测各孔光密度值,计算 50% 细胞抑制所需的药物浓度(IC₅₀),耐药指数 = 耐药细胞 IC₅₀ / 亲代细胞 IC₅₀。

2 结果

2.1 动物荷瘤模型建立情况 耐药细胞通过以高浓度的细胞量(5×10^7)接种于 SCID 小鼠 4 个月后在皮下形成肿瘤灶(0.3~0.5 cm,图 1A)。在无菌条件下取出瘤组织,经剪碎成米粒样组织块,一部分作原代培养,细胞在 3~5 d 就可以看到大量细胞从组织块的边缘生长,10 d 左右就可以传代。另一部分米粒样组织块移植于小鼠皮下致瘤,大约 3 个月左右能在皮下形成肿瘤灶(0.3~0.5 cm)。将原代培养的耐药细胞再次接种 SCID 小鼠致瘤。体外培养和体内接种反复 3 次后,细胞生长速度变快,皮下致瘤时间变短(2 个月)。将该细胞接种于 BNX 小鼠,以同样的方法使细胞经过 BNX 小鼠体内致瘤,取出组织体外培养和组织块移植,反复 3 次。最终细胞接种量减少到 3×10^6 / 鼠,3 周左右即可形成 0.3~0.5 cm 的肿块(图 1B),提高了细胞致瘤的速度并且成功率达到 80%。

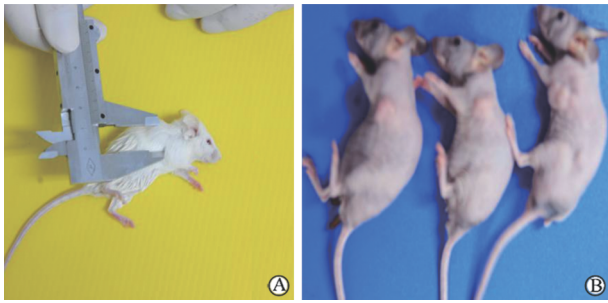


图 1 SCID 小鼠和 BNX 小鼠致瘤成功

Fig 1 Tumor nidus was observed in SCID and BNX mice

A: The tumor nidus was observed in SCID mice subcutaneously four months after injection; B: Tumor xenografts were observed in BNX mice three weeks after injection

2.2 细胞免疫化学结果 A549-Taxol 耐药细胞经过 BNX 小鼠体内致瘤、瘤组织体外培养,反复 3 次后,该耐药细胞的耐药标志物没有发生改变,GST- π 、P-gp170 和 MMP-7 在耐药细胞中高表达。见图 2。

2.3 免疫组化结果 A549-Taxol 耐药细胞经 BNX 小鼠体内致瘤、瘤组织体外培养,反复 3 次后,将小鼠皮下致瘤的组织经过石蜡包埋切片,检测到 GST- π 、P-gp170 和 MMP-7 均表现出强阳性。见图 3。

2.4 A549-Taxol 的耐药指数检测 A549-Taxol 耐药细胞经 BNX 小鼠体内致瘤、瘤组织体外培养,反复 3 次后, A549-Taxol 细胞 IC₅₀ 为 (5 200 ± 1.0) μ g/L,而亲代 A549 细胞 IC₅₀ 为 (10.5 ± 0.7) μ g/L, A549-Taxol 细胞耐药指数是亲代细胞的 520 倍。

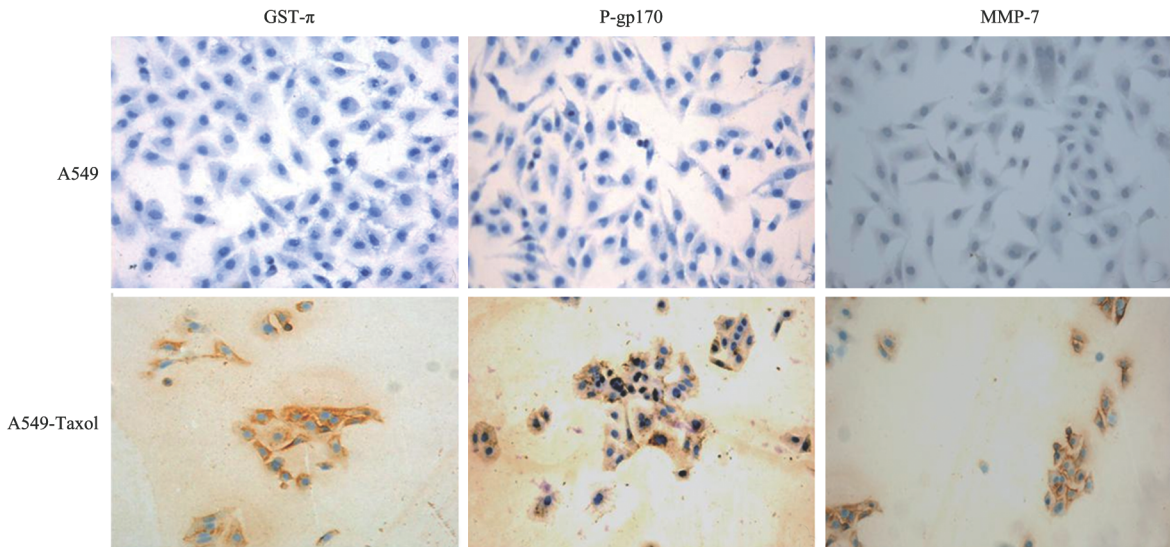


图 2 A549 亲代细胞和 A549-Taxol 耐药细胞 GST- π 、P-gp170 和 MMP-7 的表达

Fig 2 Expression of GST- π , P-gp170 and MMP-7 in A549 and A549-Taxol chemoresistant cell line

Original magnification: $\times 100$

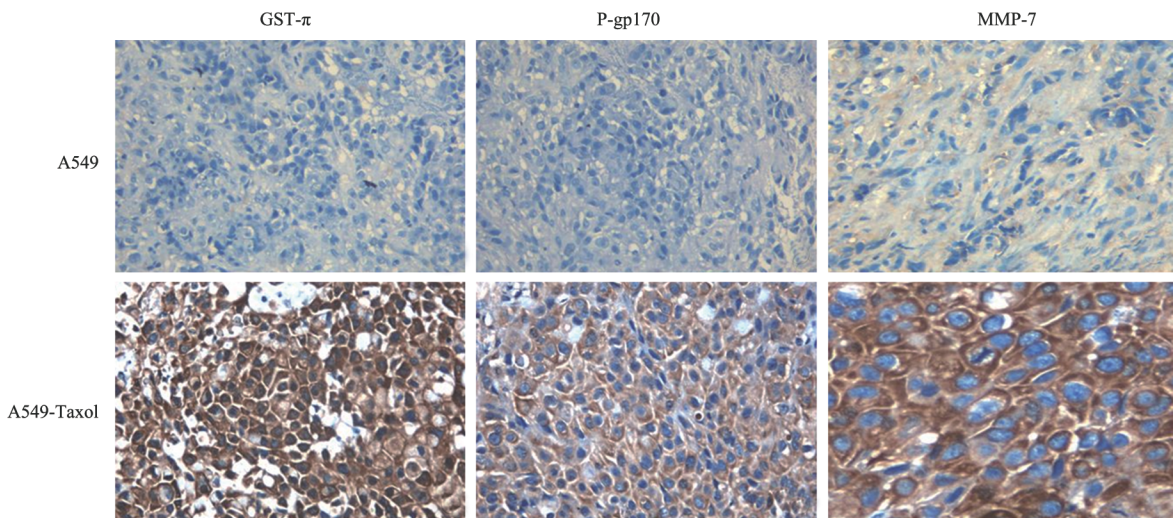


图 3 A549 和 A549-Taxol 肿瘤组织中 GST- π 、P-gp170 和 MMP-7 的表达

Fig 3 Expression of GST- π , P-gp170 and MMP-7 in A549 and A549-Taxol tumor tissues

Original magnification: $\times 200$

3 讨 论

紫杉醇作为一种新型的抗肿瘤药物,是治疗非小细胞肺癌的有效药物之一。然而肿瘤细胞耐药性的产生以及越来越多的交叉耐药现象的出现,使化疗效果受到影响,紫杉醇也不例外。紫杉醇与长春新碱、长春花碱、丝裂霉素、多柔比星等有交叉耐药,解决耐药问题是提高化疗疗效的头等大事。近年来,国内外相继建立了白血病、肺癌、胃癌、肝癌等多药耐药细胞株,在该类细胞的体外研究中,常见与MDR密切相关的生物膜表面蛋白基因过表达,如MDR1编码产物P-gp170,细胞内还原型谷胱甘肽(GSH)及GST- π ,多药耐药相关蛋白(MRP)和肺耐药蛋白(LRP),MMP^[5-6]。由于体内和体外研究尚存一定的差异,直接在动物体内建立肿瘤耐药模型尤为重要。

国内外已建立的肿瘤耐药动物模型有肝癌、胃癌、卵巢癌、白血病、胶质瘤等,其耐药模型均为多药耐药,成瘤方法主要包括移植耐药细胞株成瘤(移植型)和荷瘤动物给药诱导耐药(诱导型)两种,目前实体瘤耐药移植瘤模型多采用皮下移植和原位移植两种途径。虽然肺癌的耐药细胞株已建立了不少,但到目前为止仅见到陶黎阳等^[2]建立的肺癌耐顺铂A549/DDP动物模型,其建立的细胞耐药指数为8倍,在裸鼠皮下1~2周可形成皮下移植瘤,成瘤率为52.2%。我们建立的A549-Taxol细胞耐药指数为512倍^[3],具有高度的耐药性。一般认为耐药指数小于5为低度耐药,耐药指数5~15为中度耐药,耐药指数大于15为高度耐药^[7]。本研究利用A549-Taxol耐药细胞株,建立相应的耐药荷瘤小鼠模型。将该细胞移植于裸鼠皮下基本不致瘤,分析其原因可能耐药指数越高,其致瘤率越低,究其原因有待探索。我们将A549-Taxol耐药细胞通过体内外交替进行接种不同免疫缺陷的动物,使细胞接

种的高免疫缺陷小鼠从SCID到BNX小鼠,最近降低到裸鼠就可以成功致瘤(裸鼠资料没有显示);接种的细胞数量从原来的 5×10^7 降低到 3×10^6 ,成瘤时间从4个月降低到3周。但时间还显偏长,最好在2周左右,这样有利于将来的实验周期。细胞免疫化学和免疫组化检测P-gp170、GST- π 和MMP-7均显示其在耐药细胞A549-Taxol和移植瘤组织中呈现高表达,而在亲代A549细胞和移植瘤组织中均呈现阴性表达。通过耐药指数检测,A549-Taxol细胞的耐药指数为520倍,证明该模型的细胞保持了原具有高度耐药的特性。

通过本研究,我们初步建立了人肺腺癌耐药细胞(A549-Taxol)的动物模型,为肺癌临床个体化治疗及耐药逆转研究等提供了良好的实验动物平台。

[参 考 文 献]

- [1] 黄程辉,曹培国,谢兆霞. MCF-7/Adr细胞mdr-1基因启动子甲基化和组蛋白乙酰化状态与多药耐药的关系[J]. 中南大学学报:医学版,2009,34:369-374.
- [2] 陶黎阳,黎渐英. 肺癌A549耐药裸鼠移植瘤模型的建立[J]. 中国医药指南,2011,9:5,14.
- [3] 杨晓华,沙慧芳,冯久贤,孙强玲,储天晴,高志强. 人肺腺癌紫杉醇耐药细胞株的建立及其特性研究[J]. 现代医学,2009,37:34-37.
- [4] 何卫中,李颖则,沙慧芳,冯久贤,任书南,顾伟勇,等. 骨髓间质干细胞移植治疗大鼠急性心肌梗死的病理学观察[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11:486-489.
- [5] Jabr-Milane L S, van Vlerken L E, Yadav S, Amiji M M. Multifunctional nanocarriers to overcome tumor drug resistance[J]. Cancer Treat Rev,2008,34:592-602.
- [6] Meijerman I, Beijnen J H, Schellens J H. Combined action and regulation of phase II enzymes and multidrug resistance proteins in multidrug resistance in cancer[J]. Cancer Treat Rev,2008,34:505-520.
- [7] Snow K, Judd W. Characterisation of adriamycin- and amsacrine-resistant human leukaemic T cell lines[J]. Br J Cancer,1991,63:17-28.

[本文编辑] 孙 岩